



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :

A61K 39/39

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/20007

(43) Date de publication internationale:

4 juillet 1996 (04.07.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE95/00118

(22) Date de dépôt international: 21 décembre 1995 (21.12.95)

(30) Données relatives à la priorité:

9401173

27 décembre 1994 (27.12.94)

BE

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOLVAY
(SOCIÉTÉ ANONYME) [BE/BE]; Rue du Prince Albert
33, B-1050 Bruxelles (BE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HILGERS, Luuk
[NL/NL]; Mauritsstraat 15, NL-3583 HE Utrecht (NL).
STREBELLE, Michel [BE/BE]; Rue Sombre 84, B-1150
Bruxelles (BE).(74) Mandataires: MEYERS, Liliane etc.; Solvay (Société
Anonyme), Dept. de la Propriété Industrielle, 310, rue de
Ransbeek, B-1120 Bruxelles (BE).(81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ,
EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT,
LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG,
SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen
(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, LS,
MW, SD, SZ, UG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: VACCINE ADJUVANTS

(54) Titre: ADJUVANTS POUR VACCINS

(57) Abstract

Vaccine adjuvants comprising a liquid medium containing polymers with anionic constitutive repeating units and hydrophobic constitutive repeating units. Advantageously, said adjuvants are aqueous solutions of partially esterified polyacrylic acids. The novel adjuvants are highly stable, effective and with a relatively low level of local toxicity. Further, vaccines comprising such adjuvants and a process for producing the adjuvants are described.

(57) Abrégé

Adjuvants pour vaccins comprenant un milieu liquide contenant des polymères ayant des unités constitutionnelles répétitives anioniques et des unités constitutionnelles répétitives hydrophobes. Avantageusement, les adjuvants sont des solutions aqueuses d'acides polyacryliques partiellement estérifiés. Ces nouveaux adjuvants sont très stables, efficaces et n'ont qu'une toxicité locale relativement faible. En outre, l'invention concerne également des vaccins comprenant de tels adjuvants ainsi qu'un procédé pour leur fabrication.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Adjuvants pour vaccins

La présente invention a pour objet de nouveaux adjuvants pour vaccins.

Un antigène est défini comme étant une substance étrangère, qui, lorsqu'on l'administre par exemple par voie parentérale, induit une réponse immunitaire, entre autres la production d'anticorps. Les anticorps sont des substances contenues dans le sang et autres fluides du corps ainsi que dans les tissus, qui se lient à l'antigène pour le rendre inoffensif. Les anticorps constituent un des mécanismes naturels de défense du corps. Ils sont hautement spécifiques et peuvent tuer, lier ou rendre inoffensif l'antigène qui a induit leur formation.

L'antigène, en contact avec le système immunitaire, active donc une série complexe d'interactions cellulaires dont le but est d'éliminer l'antigène et/ou de rétablir l'équilibre précédent.

Deux des aspects caractéristiques des antigènes sont leur immunogénicité, c'est-à-dire leur capacité d'induire une réponse immunitaire *in vivo* (entre autres la formation d'anticorps spécifiques) et leur antigénicité, c'est-à-dire leur capacité d'être reconnus spécifiquement par les anticorps dont les antigènes sont à l'origine.

Il est connu qu'il est possible de stimuler la réponse immunitaire délibérément en administrant un antigène spécifique au moyen d'un vaccin. Cette procédure permet de développer dans l'organisme un état de mémoire immunitaire qui assure une réponse plus rapide et plus efficace de l'organisme lors d'un contact ultérieur avec l'antigène.

Cependant, quelques antigènes ne possèdent qu'une faible immunogénicité et induisent une réponse immunitaire insuffisante pour procurer à l'organisme une protection efficace.

L'immunogénicité d'un antigène peut être accrue en l'administrant en mélange avec des substances, appelées adjuvants, qui augmentent la réponse contre l'antigène soit en agissant directement sur le système immunologique soit en modifiant les caractéristiques pharmacocinétiques de l'antigène et en augmentant ainsi le temps d'interaction de ce dernier avec le système immunitaire.

Les adjuvants les plus répandus sont, d'une part, l'adjuvant de Freund,

- 2 -

une émulsion comprenant des mycobactéries mortes en une solution saline dans une huile minérale et d'autre part, l'adjuvant de Freund incomplet qui ne comprend pas de mycobactéries.

5 Ces adjuvants sont capables soit d'augmenter l'intensité de la réponse immunitaire à l'antigène soit de produire une activation aspécifique du système immunitaire.

Cependant l'utilisation de ces adjuvants comporte des inconvénients tels que la formation d'irritations ou d'abcès au point d'injection. De plus, pour que ces adjuvants soient efficaces, la concentration à utiliser doit être
10 supérieure à 50 % du volume injecté, ce qui limite la charge utile d'antigènes que l'on peut injecter en une dose.

La grande viscosité de ces adjuvants classiques à base d'huile et d'eau rend leur utilisation peu pratique car ils sont difficiles à introduire dans les seringues et à injecter dans les animaux.

15 Un autre type d'adjuvant décrit, comprend une solution d'acides polyacryliques [Diamanstein et al., Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8,632-636 (1970) and Diamanstein et al., Eur. J. Immunol. 1,335-339 (1971)]. L'avantage de ce type d'adjuvant est qu'il est moins visqueux que les adjuvants classiques à base d'huile minérale et d'eau. Il peut donc être
20 manipulé et injecté plus aisément. Cependant l'efficacité de ces adjuvants n'est pas comparable à celle des adjuvants à base d'eau dans l'huile minérale (W/O).

Le but de la présente invention est de proposer un adjuvant pour vaccins qui soit efficace en concentration faible et sans huile minérale.

25 Ce but est atteint par un adjuvant pour vaccins comprenant une solution aqueuse de polymères ayant des unités constitutionnelles répétitives anioniques et des unités constitutionnelles répétitives hydrophobes.

Par unités constitutionnelles répétitives anioniques, on entend désigner aux fins de la présente invention des unités monomériques, constitutives du polymère, qui contiennent des groupements capables de se dissocier dans
30 l'eau en formant des anions.

Des exemples de telles unités monomériques utiles dans la présente invention pour former les unités constitutionnelles répétitives anioniques sont (choisies parmi) les acides acrylique, méthacrylique, maléique,
35 fumarique, éthylènesulfonique, vinylsulfurique, styrènesulfonique, vinylphénylsulfurique. 2-méthacryloyloxy éthanesulfonique, 3-méthacryloyl-

oxy-2-hydroxypropanesulfonique, 2-acryl-2-méthylpropanesulfonique, 3-acrylamido-3-méthylbutanoïque, 3-méthacrylamido-3-méthylbutanoïque, vinylphosphorique, 4-vinylbenzoïque, 3-vinyloxypropane-1-sulfonique et N-vinylsuccinimide.

5 De préférence, les unités monomériques de ce type sont choisies parmi les acides acrylique, méthacrylique, maléique, fumarique, éthylène-sulfonique, vinylsulfurique et styrènesulfonique.

De manière préférée, les unités monomériques de ce type sont choisies parmi les acides acrylique, méthacrylique, maléique et fumarique.

10 De manière particulièrement préférée, les unités monomériques de ce type sont des unités d'acide acrylique.

Par unités constitutionnelles répétitives hydrophobes, on entend désigner aux fins de la présente invention des unités monomériques, constitutives du polymère, qui contiennent exclusivement des groupements hydrophobes encore s'appelés lipophiles et qui ne se dissocient pas dans l'eau.

15 Des exemples de telles unités monomériques utiles dans la présente invention pour former les unités constitutionnelles répétitives hydrophobes sont (choisies parmi) les esters alkyliques, cycloalkyliques et hydroxy-alkyliques des acides mentionnés ci-dessus (acides acrylique, méthacrylique, maléique, fumarique, éthylènesulfonique, vinylsulfurique, styrènesulfonique, vinylphénylsulfurique, 3-méthacryloyloxy-2-hydroxypropanesulfonique, 2-méthacryloyloxy éthanesulfonique, 2-acryl-2-méthylpropanesulfonique, 20 3-acrylamido-3-méthylbutanoïque, 3-méthacrylamido-3-méthylbutanoïque, vinylphosphorique, 4-vinylbenzoïque, 3-vinyloxypropane-1-sulfonique ou N-vinylsuccinimide), et les éthers (par exemple, méthoxyméthyl, éthoxy-éthyl, allyloxyméthyl, 2-éthoxyéthoxyméthyl, benzyloxyméthyl, cyclo-hexylométhyl, 1-éthoxyéthyl, 2-éthoxyéthyl, 2-butoxyéthyl, méthoxy-méthoxyéthyl, méthoxyéthoxyéthyl, 1-butoxypropyl, 1-éthoxybutyl, tétra-hydrofurfuryl ou furfuryl).

30 De préférence, les unités monomériques de ce type sont choisies parmi les esters alkyliques des acides acrylique, méthacrylique, maléique, fumarique, éthylènesulfonique, vinylsulfurique ou styrènesulfonique.

De manière préférée, les unités monomériques de ce type sont choisies parmi les esters alkyliques des acides acrylique, méthacrylique, maléique ou fumarique dont le groupe alkyle contient de 4 à 8 atomes de carbone.

35 De manière particulièrement préférée, les unités monomériques de ce

type sont les esters alkyliques linéaires d'acide acrylique dont le groupe alkyle contient de 4 à 8 atomes de carbone.

De manière particulièrement préférée, les adjuvants utilisés selon la présente invention sont les solutions aqueuses de polymères dont les unités monomériques utiles pour former les unités constitutionnelles répétitives anioniques sont constituées d'acide acrylique et dont les unités monomériques utiles pour former les unités constitutionnelles répétitives hydrophobes sont choisies parmi les esters alkyliques linéaires d'acide acrylique dont le groupe alkyle contient de 4 à 8 atomes de carbone.

La réponse humorale aux vaccins comprenant une solution aqueuse de polymères ayant des unités constitutionnelles répétitives anioniques et des unités constitutionnelles répétitives hydrophobes est supérieure à la réponse induite par des polymères ayant exclusivement des unités constitutionnelles répétitives anioniques, tels que, par exemple, les acides polyacryliques.

En effet, l'efficacité des adjuvants selon la présente invention est comparable à celle des adjuvants classiques à base d'eau dans l'huile minérale tandis que leur toxicité est, en général, nettement inférieure.

Les adjuvants selon la présente invention ne posent pas de problèmes d'instabilité comme les adjuvants classiques à base d'émulsion d'huile dans l'eau (O/W) ou d'eau dans l'huile (W/O) car ceux-ci sont toujours sensibles à des facteurs déstabilisants tels que la concentration en sels, la température, etc. ce qui n'est pas le cas des adjuvants de la présente invention. Leur stabilité correspond en principe à la stabilité des polymères contenant exclusivement des unités constitutionnelles répétitives anioniques, tels que les acides polyacryliques.

Un des avantages de l'adjuvant selon la présente invention est qu'il est efficace à faible dose. On peut donc augmenter la charge d'antigènes par volume injecté. Dans les vaccins à base de W/O, l'huile minérale occupe environ 50 % du volume du vaccin, tandis que la fraction volumique occupée par les adjuvants selon la présente invention (p. ex. à base d'acides polyacryliques liés à des chaînes d'hydrocarbures) peut être diminuée jusqu'à environ 10 % du volume de vaccin.

Selon un premier mode de réalisation avantageux, le poids moléculaire des polymères est compris entre 10 kD et 10.000 kD.

Avantageusement, le rapport molaire des unités répétitives constitutionnelles hydrophobes et des unités répétitives constitutionnelles anioniques

est compris entre 0,05 et 1,00 et, de préférence entre 0,10 et 0,40.

De préférence, la solubilité des polymères dans l'eau s'élève à au moins 1 g/litre.

5 Selon un autre aspect de la présente invention, un procédé pour obtenir le polymère est décrit. Le polymère peut être obtenu par un des procédés suivants :

1. copolymérisation de monomères anioniques et hydrophobes,
2. greffage partiel de polymères,
3. hydrolyse partielle de polymères, et
- 10 4. par un anhydride intermédiaire.

Selon un autre mode de réalisation préféré, il est proposé un vaccin dont la concentration du polymère est comprise entre 1 et 40 mg/ml de vaccin, de préférence entre 4 et 24 mg/ml, de vaccin, de plus préférence entre 8 et 16 mg/ml de vaccin.

15 Selon un autre aspect de la présente invention le vaccin comprend des antigènes inactivés du virus de la maladie de Newcastle (NDV) et/ou du virus de la bronchite infectieuse (IBV) pour la vaccination d'animaux domestiques.

20 Les vaccins comprenant un adjuvant à base d'acides polyacryliques liés à des chaînes d'hydrocarbures sont beaucoup plus stables que les vaccins comprenant un adjuvant à base d'une émulsion W/O ou O/W, ou à base d'eau dans l'huile minérale dans l'eau (W/O/W) car l'adjuvant est une solution.

25 Selon encore un autre aspect de la présente invention, on propose l'utilisation d'une solution aqueuse de polymères ayant des unités constitutionnelles répétitives anioniques et des unités constitutionnelles répétitives hydrophobes en tant qu'adjuvant dans des vaccins.

30 On prévoit, selon encore un autre aspect de la présente invention, un procédé pour préparer un vaccin en solution, caractérisé en ce qu'on mélange une solution aqueuse d'un antigène et un polymère ayant des unités constitutionnelles répétitives anioniques et des unités constitutionnelles répétitives hydrophobes.

Exemple 1

35 Différents polymères hydrosolubles selon l'invention ont été synthétisés par estérification partielle d'un acide polyacrylique d'une masse moléculaire de 450.000 D [Carbopol 907 (PAA), Goodrich, Cleveland, Ohio, U.S.A.].

Dans cette demande le terme "PAA" se réfère à "Carbopol 907". Cet acide polyacrylique a été estérifié avec différents hydroxyalcanes selon la méthode décrite par Cohen, H.L. dans J. Poly. Sci. 14, pp. 7-22 (1976). Les polymères résultant, appelés ci-après "alkyl-PAA", (cf. tableau 1) contiennent des unités monomériques de type acide acrylique et des unités monomériques de type acrylate d'alkyle.

Un gramme de PAA a été mis en solution dans 50 ml de l'alcool correspondant et la solution a été chauffée jusqu'à 135 °C. Cinquante μ l de H_2SO_4 ont été ajoutés et le mélange de réaction a été maintenu à 135 °C. La réaction a été arrêtée par refroidissement rapide du mélange de réaction et en ajoutant un volume d'eau distillée. Ensuite, le pH de la solution a été ajusté à pH = 6 et les solvants ont été évaporés à 80 °C à pression réduite (10^{-6} bar). Les produits ainsi obtenus ont été mis en solution dans de l'eau distillée, dialysés contre de l'eau distillée et puis lyophilisés.

Les composés suivants, dont les propriétés principales sont reprises dans le tableau 1, ont été synthétisés : décyl-PAA (C10-PAA), octyl-PAA (C8-PAA), butyl-PAA (C4-PAA), et méthyl-PAA (C1-PAA).

Le degré d'estérification de ces composés a été déterminé par analyse RMN. Il est exprimé en % molaire.

Les alkyl-PAA ont été mis en solution dans un tampon phosphate (pH = 7,5), en chauffant légèrement si nécessaire, et un volume de la solution d'adjuvant a été mélangé avec un volume de la solution contenant l'antigène.

Tableau 1 : Propriétés principales des alkyl-PAA synthétisés

Produit	MW PAA (kD)	Longueur de la chaîne	% ester (molaire)	Rapport molaire (hydrophobe/anionique)
C8-PAA	450	C8	27	0,37
C8-PAA	450	C8	12	0,14
C8-PAA	450	C8	16	0,19
C8-PAA	450	C8	16	0,19
C4-PAA	450	C4	16	0,19
C10-PAA	450	C10	NT	NT
C8-PAA	450	C8	48	0,92
C4-PAA	450	C4 tertiaire	NT	NT
C1-PAA	450	C1	15	0,18

NT = non mesuré (not tested)

Exemple 2

Des poules ont été immunisées par injection intramusculaire (IM) avec 0,5 ml de vaccin comprenant le virus NDV (Newcastle Disease Virus) inactivé (souche Kimber) et le virus IBV (Infectious Bronchitis Virus) inactivé, comprenant les souches M41 et D274, (iNDV/iIBV) sans adjuvant, à quatre semaines d'âge, puis à sept semaines d'âge, avec les mêmes antigènes mais cette fois-ci avec un adjuvant.

Les animaux du groupe de contrôle négatif ont reçu une solution saline tamponnée avec du phosphate (PBS) au lieu de l'adjuvant et les animaux du groupe de contrôle positif ont été vaccinés avec le vaccin comprenant un adjuvant classique à base d'eau dans l'huile minérale.

Trois semaines après la deuxième vaccination, les poules ont été saignées et dans certaines expériences, des échantillons de sang ont été collectés une deuxième fois plusieurs semaines plus tard.

Les échantillons de sang ont été incubés à température ambiante et après deux heures, les caillots sanguins ont été éliminés, les cellules restantes ont été enlevées par centrifugation (10 min. à 2700 g) et les échantillons de sérum de chaque animaux ont été recueillis et stockés à

- 20 °C jusqu'à leur utilisation.

Des plaques de microtitration à 96 puits ont été saturées avec du NDV purifié, inactivé et dilué dans une solution tamponnée au carbonate (pH = 9,6; 0,1 M) pendant deux heures à 37 °C. Les plaques ont été saturées avec 5 % (poids/volume) de lait écrémé (SKM) dans un tampon carbonate pendant une nuit à 4 °C.

Le sérum des poules a été traité avec du kaolin en incubant un volume de sérum avec 4 volumes d'une suspension à 25 % (poids/volume) de kaolin dans un tampon de borate (ICN Biomedicals, Inc. Costa Mesa, U.S.A.), pendant 30 minutes. Le kaolin a ensuite été éliminé par centrifugation.

Le sérum des poules a été prédilué 100 fois dans du PBS contenant 1 (poids/volume) d'albumine de sérum bovin (PBS/BSA). Les échantillons de sérum ont été dilués en série deux fois dans la même solution dans des plaques à 96 puits et les plaques ont été incubées pendant une à deux heures à 37 °C. Des anti-IgG de poules, produits dans la chèvre et couplés à la peroxydase, dilués 1/1000 dans du PBS/SKM, ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 1 à 2 heures à 37 °C. La quantité de peroxydase dans les plaques a été quantifiée par ajout d'une solution de substrat ABTS + H₂O₂ (Kirkegaard & Perry Labs., U.S.A.) et mesure de l'absorbance à 405 nm effectuée par un multiscan Titertek.

Les titres d'anticorps sont exprimés sous forme de valeur 2-log du coefficient de régression du diagramme de densité optique par rapport au facteur réciproque de dilution.

Le titre d'anticorps a aussi été exprimé par les moyennes géométriques (valeur 2-log +/- SEM) et les valeurs antilog de ces moyennes (2moyennes). L'activité de l'adjuvant a été exprimée en tant que pourcentage d'augmentation calculé comme suit :

$$\% \text{ augmentation} = \frac{[\text{antilog}(\text{échantillon}) - \text{antilog}(\text{contrôle négatif})]}{[\text{antilog}(\text{contrôle positif}) - \text{antilog}(\text{contrôle négatif})]} \times 100.$$

Des tests de Student ont été effectués pour analyser la signification statistique de ces résultats et la valeur $P > 0,05$ a été considérée comme étant significative.

Dans quatre expériences indépendantes, l'effet adjuvant d'un ou plusieurs acides polyacryliques partiellement estérifiés a été comparée à l'adjuvance de PAA non-estérifiés ainsi qu'avec un groupe de contrôle négatif sans adjuvant (PBS) et un groupe de contrôle positif avec de l'eau

dans l'huile minérale (W/O).

Les titres d'anticorps ont été déterminés par la méthode ELISA indirecte, décrite ci-dessus. Les résultats de ces expériences sont repris dans le tableau 2.

5. Tableau 2 : Effets de différentes préparations d'alkyl-PAA sur la réponse immunologique contre NDV/IBV, mesurés par ELISA indirect sur des poules.

Adjuvant [mg/ml]	n	Titre d'anticorps contre NDV			Adjuvance
		moyenne 2-log	SEM	antilog	% augment.
Expérience I					
W/O	40	9.6	0.7	776	100
PBS	40	5.6	1.0	49	0
PAA [8]	20	7.1	1.1	139	12
PAA [40]	20	6.8	1.0	110	8
C8-PAA [8]	20	9.0	0.6	491	61
C8-PAA [40]	20	9.3	0.8	630	80
Expérience II					
W/O	40	9.5	0.5	724	100
PBS	40	6.8	0.9	111	0
PAA [8]	20	7.4	1.0	162	8
PAA [40]	20	8.3	0.7	324	34
C8-PAA [8]	20	8.8	0.6	452	55
C8-PAA [40]	20	8.2	1.1	274	28
C8-PAA [8]	20	8.5	0.7	372	42
C8-PAA [40]	20	8.6	0.7	393	45
C8-PAA [8]	20	8.9	0.5	488	61
C8-PAA [40]	20	8.7	0.9	405	47

- 10 -

Expérience III					
W/O	40	8.9	0.9	477	100
PBS	40	5.7	0.6	52	0
PAA [8]	20	6.9	0.8	119	16
PAA [24]	20	7.3	0.7	158	25
C8-PAA [8]	20	8.4	0.7	338	69
C8-PAA [8]	20	8.3	0.7	315	64
C8-PAA [24]	20	8.3	0.5	315	64
C8-PAA [8]	20	9.1	0.3	549	121
C8-PAA [8]	20	8.4	0.5	338	69
C8-PAA [24]	20	8.0	0.6	256	49
C4-PAA [8]	20	8.8	0.6	446	96
C4-PAA [24]	20	8.6	0.5	388	81
C10-PAA [8]	20	7.1	0.7	137	20
C10-PAA [24]	20	5.8	0.6	56	0
Expérience IV					
W/O	40	8.6	1.0	388	100
PBS	40	5.2	1.1	37	0
PAA [1]	20	6.2	1.7	74	9
PAA [2]	20	6.0	1.0	64	6
PAA [4]	20	6.8	1.1	111	18
PAA [8]	20	7.2	1.0	147	26
PAA [16]	20	7.4	0.8	168	32
C4-PAA [1]	20	7.7	0.7	208	42
C4-PAA [2]	20	8.1	0.5	274	57
C4-PAA [4]	20	8.5	0.5	362	79

- 11 -

C4-PAA [8]	20	8.7	0.6	416	92
C4-PAA [16]	20	9.1	0.4	549	124
C8-PAA [2]	20	8.4	0.6	338	73
C8-PAA [8]	20	8.9	0.8	478	107
C8-PAA [8]	20	8.3	0.7	315	67
*C4-PAA [8]	20	7.3	0.9	158	29
C1-PAA [8]	20	8.2	0.7	294	62

n = nombre de poules par groupe

SEM = déviation standard de la moyenne (Standard Error of Mean)

* = C4tertiaire

5 Les groupes de contrôle positif et négatif ont donné des titres d'anticorps reproductibles dans les quatre expériences indépendantes et les titres d'anticorps du contrôle positif ont été de trois à quatre unités 2-log supérieures (8 à 16 fois) à ceux des groupes de contrôle négatif.

10 Les PAA (non-modifiés) ont augmenté le titre en anticorps anti-iNDV entre 6 % et 32 % (Expérience I à IV) et il semble que cette augmentation dépende de la dose (Expérience IV). Une stimulation optimale est obtenue avec une dose de 40 mg/ml (Expérience II).

15 Les alkyl-PAA ont provoqué des réponses significativement plus élevées que les PAA non-modifiés. L'octyl-PAA et le butyl-PAA produisaient des titres plus élevés que le décyl-PAA, le t-butyl-PAA ou le méthyl-PAA.

Des réponses maximales ont été obtenues avec des doses variant de 8 mg/ml à 40 mg/ml d'octyl-PAA ou de butyl-PAA. Les réponses ont été aussi élevées que les réponses obtenues avec un adjuvant classique à base d'huile et d'eau, utilisé en tant que contrôle positif.

20 L'expérience IV montre que la réponse dépend de la dose de PAA modifiés utilisée, du moins en ce qui concerne le butyl-PAA dans une plage allant de 1 mg/ml à 16 mg/ml. Même à dosages très faibles - de 1 mg/ml à 2 mg/ml -, le butyl-PAA augmentait la réponse humorale d'une manière significative. Des titres d'anticorps comparables à ceux rencontrés avec des doses beaucoup plus élevées de PAA non-modifiés ont été atteints.

25 La réponse humorale augmente avec la dose de PAA modifiés employée et atteint un maximum qui est équivalent à celle provoquée par les adjuvants

classiques à base d'eau et huile. Des doses de 24 mg/ml et 40 mg/ml de butyl-PAA et d'octyl-PAA induisaient des réponses parfois plus faibles que des doses de 8 mg/ml, indiquant l'existence d'une concentration optimale pour ces composés, qui est comprise entre 8 et 24 mg/ml.

5

Exemple 3

Les titres d'anticorps anti-NDV dans les échantillons de sérum individuels ont également été déterminés par un kit ELISA anti-iNDV, disponible dans le commerce (Flockcheck Newcastle disease antibody test kit; IDEXX Labs, Inc. Maine, U.S.A.) selon le mode opératoire.

10

Les résultats de ces analyses sont repris dans le tableau 3.

Tableau 3 : Effet de différentes préparations de PAA sur le titre d'anticorps anti-iNDV mesuré par un kit IDEXX ELISA sur des poules.

Adjuvant [mg/ml]	n	Titre d'anticorps contre NDV			Adjuvance
		moyenne 2-log	SEM	antilog	% augment.
Expérience I					
W/O	40	14.5	0.7	23170	100
PBS	40	7.9	2.2	239	0
PAA [8]	20	NT			
C8-PAA [8]	20	13.7	0.8	13308	57
C8-PAA [40]	20	12.9	1.7	7643	32
Expérience II					
W/O	40	13.9	0.8	15268	100
PBS	40	8.7	1.9	416	0
PAA [8]	20	12.6	1.1	6209	39
PAA [40]	20	NT			
C8-PAA [8]	20	12.4	1.1	5404	36
C8-PAA [40]	20	NT			
C8-PAA [8]	20	12.3	1.5	5042	31
C8-PAA [40]	20	12.4	1.2	5404	36

- 13 -

C8-PAA [8]	20	12.5	1.0	5793	36
C8-PAA [40]	20	12.0	1.9	4096	25
Expérience III					
W/O	40	13.1	1.3	8780	100
PBS	40	8.2	1.8	294	0
PAA [8]	20	NT			
PAA [24]	20	NT			
C8-PAA [8]	20	13.5	1.0	11585	133
C8-PAA [8]	20	12.8	1.1	7132	81
C8-PAA [24]	20	13.5	1.3	11585	133
C8-PAA [8]	20	13.7	0.6	13308	153
C8-PAA [8]	20	12.5	1.1	5793	65
C8-PAA [24]	20	NT			
C4-PAA [8]	20	13.7	1.2	13308	158
C4-PAA [24]	20	14.2	0.8	18820	218
C10-PAA [8]	20	NT			
C10-PAA [24]	20	NT			
Expérience IV					
W/O	40	12.9	1.6	7643	100
PBS	40	7.5	2.3	181	0
PAA [1]	20	NT			
PAA [2]	20	NT			
PAA [4]	20	NT			
PAA [8]	20	NT			
PAA [16]	20	NT			
C4-PAA [1]	20	NT			

C4-PAA [2]	20	NT			
C4-PAA [4]	20	13.4	1.0	10809	142
C4-PAA [8]	20	13.4	1.0	10809	142
C4-PAA [16]	20	13.8	0.9	14263	189
C8-PAA [2]	20	NT			
C8-PAA [8]	20	13.2	0.9	9410	124
C8-PAA [8]	20	12.0	1.6	4096	52
*C4-PAA [8]	20	NT			
C1-PAA [8]	20	12.2	1.4	4705	60

n = nombre de poules par groupe

SEM = déviation standard de la moyenne (Standard Error of Mean)

NT = non mesuré (not tested)

* = C4tertiaire

5 Dans les quatre expériences, les différences des valeurs moyennes des contrôles négatifs ont été faibles. Dans les quatre expériences, les différences des valeurs moyennes des contrôles positifs ont également été faibles. L'adjuvance des PAA modifiés se situe entre 23 et 218 %, le butyl-PAA et l'octyl-PAA ont été plus efficaces que le méthyl-PAA ou le décyl-PAA.

10 Les résultats obtenus par cette méthode confirment ceux de la première méthode d'analyse, développée spécialement pour ces tests.

Exemple 4

15 Dans des plaques à 96 puits, des dilutions progressives de l'anti-sérum ont été incubées avec 10^6 particules infectieuses (PFU) d'une souche NDV. Kimber pendant 18 heures à 37 °C. A chaque puits, 10^5 cellules de la lignée aviaire QT35 ont été ajoutées et mises en plaque. Ces plaques ont été couvertes et incubées pendant 48 heures supplémentaires à 37 °C. Des dilutions de sérum apportant 50 % de réduction du nombre de particules infectieuses ont été considérées comme étant le titre d'anticorps.

20 Les résultats de ces expériences sont repris dans le tableau 4.

Tableau 4 : Effets de différentes préparations de PAA sur le titre d'anticorps anti-iNDV mesurés par neutralisation de virus (VN) sur des poules.

- 15 -

Adjuvant [mg/ml]	n	Titre d'anticorps contre NDV			Adjuvance	
		moyenne 2-log	SEM	antilog	% augment.	
Expérience I						
W/O	40	16.3	2.1	80684	100	
PBS	40	8.1	1.8	274	0	
PAA [8]	20	11.6	2.0	3104	4	
C8-PAA [8]	20	15.1	2.4	35120	43	
C8-PAA [40]	20	14.0	2.3	16384	20	
Expérience II						
W/O	40	16.0	2.0	65536	100	
PBS	40	11.1	2.0	2194	0	
PAA [8]	20	11.5	1.8	2896	1	
PAA [40]	20	13.0	2.2	8192	9	
C8-PAA [8]	20	15.2	1.8	37641	56	
C8-PAA [40]	20	11.4	2.9	2702	1	
C8-PAA [8]	20	13.8	2.2	14263	19	
C8-PAA [40]	20	14.7	2.0	26616	38	
C8-PAA [8]	20	15.6	1.6	49667	75	
C8-PAA [40]	20	13.7	3.0	13308	18	
Expérience III						
W/O	40	16.2	1.0	75281	100	
PBS	40	10.4	1.9	1351	0	
PAA [8]	20	12.6	2.2	6208	8	
PAA [24]	20	14.8	1.2	28526	37	
C8-PAA [8]	20	15.4	1.7	43237	57	
C8-PAA [8]	20	14.6	1.4	24834	32	

- 16 -

C8-PAA [24]	20	15.9	0.8	61147	81
C8-PAA [8]	20	16.0	0.6	65536	87
C8-PAA [8]	20	15.5	1.4	46341	61
C8-PAA [24]	20	15.9	0.8	61147	81
C4-PAA [8]	20	16.1	0.6	70240	93
C4-PAA [24]	20	16.2	2.4	75281	100
C10-PAA [8]	20	13.3	1.7	10086	12
C10-PAA [24]	20	12.1	1.5	43900	58
Expérience IV					
W/O	40	15.4	2.0	43238	100
PBS	40	9.3	1.2	630	0
PAA [1]	20	10.9	2.8	1911	3
PAA [2]	20	10.2	1.1	1176	1
PAA [4]	20	11.0	1.3	2048	3
PAA [8]	20	12.1	1.6	4390	9
PAA [16]	20	12.6	1.3	6208	13
C4-PAA [1]	20	12.5	1.6	5793	12
C4-PAA [2]	20	14.1	1.1	17560	40
C4-PAA [4]	20	14.9	1.2	30574	70
C4-PAA [8]	20	14.7	1.2	26616	61
C4-PAA [16]	20	15.6	1.4	49667	115
C8-PAA [2]	20	14.3	1.1	20171	46
C8-PAA [8]	20	15.7	1.5	53232	123
C8-PAA [8]	20	14.0	1.2	16384	37
*C4-PAA [8]	20	12.0	1.3	4096	8
C1-PAA [8]	20	13.4	1.9	10809	24

- 17 -

n = nombre de poules par groupe

SEM = déviation standard de la moyenne (Standard Error of Mean)

* = C4tertiaire

5 Les animaux des groupes de contrôle négatif et positif donnaient des titres d'anticorps reproductibles dans les quatre expériences indépendantes. Le pourcentage d'augmentation réalisé par le PAA non modifié se situait entre 4 à 37 % en fonction de la dose de PAA utilisée.

Tous les alkyl-PAA induisaient des réponses plus élevées que les PAA non modifiés.

10 La qualité des réponses induites par les alkyl-PAA dépendait du type de chaîne alkyle utilisée et du degré d'estérification du PAA.

Pour le butyl-PAA, on a observé une relation étroite entre la dose d'adjuvants et la réponse humorale (expérience IV) tandis que pour l'octyl-PAA, les réponses à une dose de 40 mg/ml ne provoquait pas toujours une
15 réponse plus élevée que des doses plus faibles, indiquant que l'optimum de la quantité d'octyl-PAA se situerait entre 24 mg/ml et 40 mg/ml.

L'évaluation de la fonction biologique des anticorps effectuée par le test de neutralisation de virus (VN) montrait qu'il existe une corrélation étroite entre les deux tests ELISA et le test VN.

20 Exemple 5

L'adjuvance des PAA a aussi été testée sur des souris.

Des groupes de six souris ont été vaccinés avec 25 µl d'un vaccin comprenant 1 volume d'une solution d'antigènes composée de 10 µg de virus influenza inactivé (souche MRC-11) et 1 mg d'ovalbumine (OVA)
25 (SIGMA, U.S.A.) par ml et un volume d'adjuvant. Trois semaines après l'injection, les titres d'anticorps ont été déterminés par la méthode indirecte ELISA décrite à l'Exemple 1.

Le sérum de souris a été prédilué dans une solution à 5 % de lait écrémé dans du PBS (PBS/SKM). Les échantillons de sérum ont été dilués
30 en série deux fois dans la même solution dans des plaques à 96 puits et les plaques ont été incubées pendant une à deux heures à 37 °C. Des anti-IgG de souris, produits dans la chèvre et couplés à une peroxydase, dilués 1/300 dans PBS/BSA, ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 1 à 2 heures à 37 °C. La quantité de peroxydase dans les plaques a été quantifiée
35 par une solution substrat de ABTS + H₂O₂ (Kirkegaard & Perry Labs., U.S.A.) et la mesure de l'absorbance à 405 nm a été effectuée par un

multiscan Titertek.

Les résultats de ces expériences sont repris dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Adjuvance des alkyl-PAA sur des souris

Tableau 5 : Adjuvance des allyl-1

n = nombre de poules par groupe

5 SEM = déviation standard de la moyenne (Standard Error of Mean)

L'accroissement de l'adjuvance des PAA par l'addition des chaînes aliphatiques n'a été confirmé que partiellement sur des souris, car les deux expériences indépendantes montraient des effets différents.

Exemple 6

10 Outre l'adjuvance, d'autres propriétés sont importantes pour l'évaluation d'un vaccin. Entre autres, la réaction locale est un aspect important, bien qu'une certaine réaction à l'endroit d'injection soit acceptée en général

par certaines espèces d'animaux. La toxicité locale a été testée in vivo en suivant le gonflement de la patte des souris après l'injection du vaccin dans le coussinet de la patte de la souris. Il a été montré que cette méthode est très sensible.

5 On a injecté (sous-cutané), dans la plante du pied arrière gauche de groupes de six souris, 25 μ l +/- 5 μ l d'un vaccin contenant 1 volume d'un adjuvant dilué avec un volume d'une solution d'antigène contenant 10 μ g MRC-11 et 1 mg d'ovalbumine par ml de NaCl 0.9 % (p/v).

10 L'épaisseur de la patte a été mesurée un jour avant l'injection et à différents intervalles après l'injection par un appareil semi-électronique spécialement mis au point pour ce propos par l'Université d'Etat d'Utrecht aux Pays Bas. On a montré que la précision de cet appareil a été jusqu'à 0,02 mm près.

15 Le gonflement de la patte a été calculé en soustrayant l'épaisseur avant et après le traitement et est exprimé en tant que 0,01 mm.

Les résultats de ces expériences sont repris dans le tableau 6.

Tableau 6 : Réactogénicité de PAA et d'alkyl-PAA sur des souris.

Expérience I

Adjuvant [mg/ml]	gonflement moyen (10^{-2} mm)					
	Jours					
	1	2	6	10	17	22
PAA [4]	27	63	96	47	31	29
C8-PAA [4]	82	113	174	108	71	46
C8-PAA [4]	185	186	197	126	91	49
C8-PAA [4]	181	191	165	82	58	38
C4-PAA [4]	76	111	222	138	85	72
C8-PAA [4]	23	17	33	8	16	7
PBS	2	0	0	0	0	0

Expérience II

Adjuvant [mg/ml]	gonflement moyen (10^{-2} mm)							
	Jours							
	1	2	3	7	12	20	26	35
PAA [4]	37	73	91	68	51	40	38	42
PAA [2]	33	52	36	37	30	19	14	14
C8-PAA [4]	171	154	157	107	70	49	35	34
C8-PAA [2]	125	79	124	70	36	28	19	29
C4-PAA [4]	72	77	135	120	88	68	59	61
C4-PAA [2]	105	80	74	84	62	38	42	69
PBS	3	0	0	0	0	0	0	0

La toxicité locale des PAA sur des souris est modérée, le gonflement de la patte des souris atteint un maximum après quelques jours et décline ensuite graduellement au bout de deux ou trois semaines.

5 L'addition de chaînes alkyles sur les PAA augmente la réaction locale qui disparaît cependant au bout de deux à cinq semaines selon la quantité injectée. Les groupes octyles incitent une réaction plus forte que les groupes butyles.

10 Par contre, le gonflement provoqué par l'injection d'un adjuvant à base d'huile et d'eau provoque des gonflements beaucoup plus importants qui persistent pendant plus de huit semaines.

REVENDICATIONS

1 - Adjuvants pour vaccins comprenant une solution aqueuse d'un polymère ayant des unités constitutionnelles répétitives anioniques et des unités constitutionnelles répétitives hydrophobes.

5 2 - Adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que les unités monomériques pour former les unités constitutionnelles répétitives anioniques sont choisies parmi les acides acrylique, méthacrylique, maléique, fumarique, éthylènesulfonique, vinylsulfurique, styrènesulfonique, vinylphénylsulfurique, 2-méthacryloyloxy éthanesulfonique, 10 3-méthacryloyloxy-2-hydroxypropanesulfonique, 2-acryl-2-méthylpropanesulfonique, 3-acrylamido-3-méthylbutanoïque, 3-méthacrylamido-3-méthylbutanoïque, vinylphosphorique, 4-vinylbenzoïque, 3-vinyloxypropane-1-sulfonique et N-vinylsuccimidique.

15 3 - Adjuvant selon la revendication 2, caractérisé en ce que les unités monomériques pour former les unités constitutionnelles répétitives anionique sont choisies parmi les acides acrylique, méthacrylique, maléique, fumarique, éthylènesulfonique, vinylsulfurique et styrènesulfonique.

20 4 - Adjuvant selon la revendication 3, caractérisé en ce que les unités monomériques pour former les unités constitutionnelles répétitives anionique sont choisies parmi les acides acrylique, méthacrylique, maléique et fumarique.

5 - Adjuvant selon la revendication 4, caractérisé en ce que les unités monomériques pour former les unités constitutionnelles répétitives anionique sont des unités d'acide acrylique.

25 6 - Adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que les unités monomériques pour former les unités constitutionnelles répétitives hydrophobes sont choisies parmi les esters alkyliques, cycloalkyliques et hydroxyalkyliques des acides acrylique, méthacrylique, maléique, fumarique, éthylènesulfonique, vinylsulfurique, styrènesulfonique, 30 vinylphénylsulfurique, 3-méthacryloyloxy-2-hydroxypropanesulfonique, 2-méthacryloyloxy éthanesulfonique, 2-acryl-2-méthylpropanesulfonique, 3-acrylamido-3-méthylbutanoïque, 3-méthacrylamido-3-méthylbutanoïque,

- 22 -

vinylphosphorique, 4-vinylbenzoïque, 3-vinyloxypropane-1-sulfonique ou N-vinylsuccinimide et les éthers.

5 7 - Adjuvant selon la revendication 6, caractérisé en ce que les unités monomériques pour former les unités constitutionnelles répétitives hydrophobes sont choisies parmi les esters alkyliques des acides acrylique, méthacrylique, maléique, fumarique, éthylènesulfonique, vinylsulfurique ou styrènesulfonique.

10 8 - Adjuvant selon la revendication 7, caractérisé en ce que les unités monomériques pour former les unités constitutionnelles répétitives hydrophobes sont choisies parmi les esters alkyliques des acides acrylique, méthacrylique, maléique ou fumarique dont le groupe alkyle contient de 4 à 8 atomes de carbone.

15 9 - Adjuvant selon la revendication 8, caractérisé en ce que les unités monomériques pour former les unités constitutionnelles répétitives hydrophobes sont choisies parmi les esters alkyliques linéaires d'acide acrylique dont le groupe alkyle contient de 4 à 8 atomes de carbone.

20 10 - Adjuvant selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le rapport molaire des unités répétitives constitutionnelles hydrophobes et des unités répétitives constitutionnelles anioniques est compris entre 0,05 et 1,00.

11 - Adjuvant selon la revendication 1 à 10, caractérisé en ce que le rapport molaire des unités répétitives constitutionnelles hydrophobes et des unités répétitives constitutionnelles anioniques est compris entre 0,10 et 0,40.

25 12 - Adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le poids moléculaire des polymères est compris entre 10 kD et 10.000 kD.

13 - Adjuvant selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le milieu liquide est une solution aqueuse, une suspension ou une émulsion.

30 14 - Adjuvant selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le polymère est soluble dans l'eau.

- 23 -

15 - Vaccin comprenant une quantité immunogénique d'un antigène et un adjuvant selon l'une des revendications précédentes.

5 16 - Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce que la concentration d'adjuvants est comprise entre 1 et 40 mg/ml, de préférence entre 4 et 24 mg/ml.

17 - Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce que, outre, l'adjuvant, il comprend des antigènes inactivés du virus de la maladie de Newcastle (NDV) et/ou du virus de la bronchite infectieuse (IBV) pour la vaccination d'animaux domestiques.

10 18 - Utilisation d'un polymère ayant des unités répétitives constitutionnelles hydrophobes et des unités répétitives constitutionnelles anioniques en tant qu'adjuvant dans des vaccins.

15 19 - Utilisation selon la revendication 18, caractérisé en ce que le polymère a des unités répétitives constitutionnelles hydrophobes selon l'une des revendications 2 à 5 et des unités répétitives constitutionnelles anioniques selon l'une des revendications 6 à 9.

20 20 - Procédé pour préparer un vaccin en solution caractérisé en ce qu'on mélange une solution aqueuse d'un antigène et un polymère ayant des unités répétitives constitutionnelles hydrophobes et des unités répétitives constitutionnelles anioniques.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter- national Application No.
PCT/BE 95/00118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INFECT. IMMUN. (1978), 19(2), 667-75 . KREUTER, JOERG ET AL 'Mode of action of immunological adjuvants: some physicochemical factors influencing the effectivity of polyacrylic adjuvants' see the whole document	1-20
A	EP,A,0 273 512 (DUPHAR INTERNATIONAL) 6 July 1988 see the whole document	1-20
A	WO,A,92 04915 (NORTH AMERICAN VACCINE) 2 April 1992 see the whole document	1-20
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 1996

Date of mailing of the international search report

18.04.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/BE 95/00118

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 1, pages 335-340, DIAMANSTEIN T. 'Stimulation of humoral antibody formation by polyanions' cited in the application see the whole document ---	1-20
X	US,A,3 790 665 (GLASS M.E. ET AL.) 5 February 1974 see the whole document ---	1,15-20
X	VACCINE, vol. 8, no. 6, December 1990 pages 573-576, XP 000168477 TETSUYA OKA ET AL. 'INFLUENZA VACCINE: ENHANCEMENT OF IMMUNE RESPONSE BY APPLICATION OF CARBOXY-VINYLPOLYMER' see the whole document ---	1,15-20
X	INFECTION AND IMMUNITY, vol. 13, no. 1, January 1976 WASHINGTON US, pages 204-210, KREUTER J. ET AL. 'New Adjuvants on a Polymethacrylate Base' see the whole document ---	1,15-20
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 133, no. 6, December 1984 BALTIMORE US, pages 3167-3175, HUNTER R.L. ET AL. 'THE ADJUVANT ACTIVITY OF NONIONIC BLOCK POLYMER SURFACTANTS' see the whole document -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/BE 95/00118

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-273512	06-07-88	IE-B- 60698	10-08-94
		JP-A- 63165329	08-07-88
		US-A- 5026546	25-06-91
WO-A-9204915	02-04-92	AU-B- 8441991	15-04-92
		CA-A- 2090673	18-03-92
		CN-A- 1060408	22-04-92
		CZ-A- 9300429	13-04-94
		EP-A- 0549617	07-07-93
		HU-A- 64237	28-12-93
		JP-T- 6500772	27-01-94
		OA-A- 9776	30-11-93
		SK-A- 18693	11-08-93
US-A-3790665	05-02-74	US-A- 3919411	11-11-75
		CA-A- 950830	09-07-74
		CH-A- 566140	15-09-75
		DE-A- 1907098	04-09-69
		FR-A- 2002454	17-10-69
		GB-A- 1263480	09-02-72
		US-A- 3639577	01-02-72